

## ••• КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ ••• BRIEF COMMUNICATIONS •••

---

УДК: [57.04 + 616.5]. 616-003. 616-008

### **Влияние аутотрансплантации фибробластами и композицией фибробластов с кератиноцитами в зону лучевого ожога кожи на динамику экспрессии генов металлотioneинов, убиквитина и белка p53** Л.В.Алтухова

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)  
altuhovalv@gmail.com*

Изучена экспрессия генов металлотioneинов 1–5, убиквитина B, белка p53 и их продуктов в зоне рентгеновского ожога кожи 3-й степени у морских свинок при ежедневной 35-суточной аутотрансплантации в неё фибробластов и смеси фибробластов с кератиноцитами, начатой сразу после облучения. Показано, что в зоне ожога непрерывно снижается экспрессия генов металлотioneинов 1–5, убиквитина B и содержание этих белков, а экспрессия гена белка p53 и его содержание повышаются. Введение в зону ожога аутофибробластов или их смеси с аутокератиноцитами повышает (в большей степени клеточная смесь) экспрессию генов металлотioneинов 1–5 и убиквитина B и их содержание при снижении экспрессии гена белка p53 и нормализации его содержания.

**Ключевые слова:** *лучевой ожог, фибробласты, кератиноциты, аутотрансплантация, металлотioneины, убиквитин, белок p53.*

### **Вплив аутотрансплантації фібробластами і композицією фібробластів з кератиноцитами в зону променевого опіку шкіри на динаміку експресії генів металотіонеїнів, убіквітину і білка p53** Л.В.Алтухова

Вивчено експресію генів металотіонеїнів 1–5, убіквітину B, білка p53 та їх продуктів у зоні рентгенівського опіку шкіри 3-го ступеня у морських свинок при щоденній 35-добовій аутотрансплантації в неї фібробластів і суміші фібробластів з кератиноцитами, що була розпочата відразу після опромінення. Показано, що в зоні опіку безперервно знижується експресія генів металотіонеїнів 1–5, убіквітину B і вміст цих білків, а експресія гену білка p53 і його вміст підвищуються. Введення в зону опіку аутофібробластів або їх суміші з аутокератиноцитами підвищує (більшою мірою клітинна суміш) експресію генів металотіонеїнів 1–5 і убіквітину B та їх вміст при зниженні експресії гена білка p53 і нормалізації його вмісту.

**Ключові слова:** *променевий опік, фібробласти, кератиноцити, аутотрансплантація, металотіонеїни, убіквітин, білок p53.*

### **Effect of autotransplantation of fibroblasts and keratinocytes with fibroblasts mixture in the area of skin radiation burn on the dynamics of metallothioneins, ubiquitin and p53 genes expression** L.V.Altuhova

There has been studied gene expression of metallothioneins 1–5, ubiquitin B, p53 protein and their products in the area of the 3rd degree X-ray skin burn in guinea pigs at daily 35-day autotransplantation of fibroblasts and a mixture of fibroblasts and keratinocytes started immediately after exposure. It has been shown that in the burn zone gene expression of metallothioneins 1–5, ubiquitin B and content of these proteins continually decreases, and gene expression of p53 protein and its content increase. Introduction of autofibroblasts or mixtures thereof with keratinocytes into the burn zone increases metallothioneins 1–5 and ubiquitin B gene expression and content of these proteins (to a greater degree at cell mixture administering), while reducing p53 protein gene expression and normalization of its content.

**Key words:** *radiation burn, fibroblasts, keratinocytes, autotransplantation, metallothioneins, ubiquitin, p53.*

### **Введение**

В предыдущих работах (Кот и др., 2013; Алтухова и др., 2013; Алтухова и др., 2015) было показано, что ежедневное глубокое введение в течение 35 суток как смеси аутофибробластов с аутокератиноцитами, так и одних аутофибробластов в зону рентгеновского ожога кожи у морских свинок, начатое через 1 час после облучения, приводит к существенному торможению развития ожога и заживлению лучевой язвы. В основе этого лежит повышение уровня экспрессии генов структурных и регуляторных белков, гликозаминогликанов, ферментов их синтеза и распада, а также генов факторов роста фибробластов и противовоспалительных цитокинов, в условиях непрерывного замещения гибнущих клеток живыми в зоне ожога. Лечебная эффективность аутотрансплантации смесью фибробластов с кератиноцитами существенно выше по сравнению с аутотрансплантацией одними только фибробластами. Это является результатом взаимной стимуляции аутофибробластов и аутокератиноцитов к пролиферации и синтезу биологически активных веществ, индуцирующих регенерацию тканей и заживление раны (Blomme et al., 1999; Werner et al., 2007).

К таким веществам относятся металлотioneины, убиквитин и белок p53, которые обладают регуляторными и защитными свойствами, особенно важными в условиях стресса различного происхождения.

В настоящее время установлено, что металлотioneины, кроме детоксикации ионов тяжёлых металлов путём их связывания, поддерживают равновесие в окислительно-восстановительных реакциях и могут играть роль полифункциональных внутриклеточных регуляторов, принимающих участие в процессах клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза (Пыхтеева, 2010; Данилин, 2010; Кутяков, Салмина, 2014).

Убиквитин участвует в деградации белков, пролиферации и дифференцировке клеток, репарации ДНК, а также в процессах ответной реакции на стресс (Schnell, Hicke, 2003; Kimura, Tanaka, 2010).

Белок p53 контролирует клеточный цикл и репликацию ДНК и в стрессовом состоянии запускает апоптоз, обеспечивая стабильность генома (Lowe et al., 1993).

В данной работе изучена динамика экспрессии генов этих белков и их содержания в зоне ожога при обоих методах аутотрансплантации.

### **Объекты и методы исследования**

Эксперименты проведены на морских свинках массой 350–450 г с соблюдением рекомендаций о нормах биомедицинской этики, согласно закону Украины «Про захист тварин від жорстокого поводження, 2006» (<http://www.uapravo.net/data/base12/ukr12108.htm>).

Лучевые ожоги 3-й степени кожи левого бедра вызывали у животных рентгеновским излучением, как описано в (Altuhova et al., 2015). Фибробласты и кератиноциты получали стандартными методами (Rittié, Fisher, 2005) и (Shaw, 1996) соответственно, из биоптатов кожи правого бедра, взятых за 32 суток до облучения. Для аутотрансплантации использовали оба типа клеток 3-го пассажа, которые хранили в жидком азоте (Келлер и др., 2000). Объёмную аутотрансплантацию проводили 6 инъекциями по контуру зоны облучения под углом 45° к её центру на глубину 1 мм. Каждая инъекция содержала  $(200-210) \times 10^3$  фибробластов либо смесь  $(150-160) \times 10^3$  фибробластов +  $(130-140) \times 10^3$  кератиноцитов в 100 мкл физиологического раствора.

Образцы тканей из зоны ожога облучённых нелеченных и леченных, а также из аналогичных участков правого бедра у контрольных необлучённых животных брали после декапитации в 1-е, 20-е и 35-е сутки аутотрансплантации.

После выделения из образцов тотальной РНК (наборы «RNeasy FFPE Kit», США) и синтеза кДНК (наборы QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, США) с использованием ген-специфичных праймеров и Су3-меченных нуклеотидов (производство Arrayit и Life Technologies, США, соответственно) проводили амплификацию на термоциклере BIO-RAD iCycler.

Экспрессию генов измеряли с помощью гибридизации на ДНК-микрочипах (производство Arrayit, США). Отмывку проводили в камерах для гибридизации SecureSeal.

Содержание исследуемых белков в образцах тканей проводили иммунохимическим анализом с использованием ELISA-микрочипов и наборов Antibody Array Assay Kit (KAS20, Full Moon BioSystems, Inc.)

Оба типа чипов сканировали на конфокальном флуоресцентном сканере Affymetrix 428, используя программное обеспечение Jaguar. Полученные значения флуоресценции выражали в единицах флуоресценции (rfu)/мг ткани.

Анализ и статистическую обработку результатов экспериментов проводили в пакете программы Origin 7.5 pro (Glantz, 2007). Достоверными считали различия с  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены результаты измерения экспрессии генов изученных белков, а в табл. 2 – содержание этих белков в области ожога кожи у облучённых нелеченных и леченных обоими видами аутотрансплантации животных, а также в аналогичных участках кожи контрольных необлученных животных.

Таблица 1.

Влияние аутотрансплантации фибробластами и смесью фибробластов с кератиноцитами в зону лучевого ожога кожи у морских свинок на динамику экспрессии генов металлотионеинов, убиквитина и белка p53, (rfu/мг ткани)  $\times 10^3$

Сутки после облучения	Условия облучения и лечения животных	Белок и его ген							
		Металло-тионеин 1	Металло-тионеин 2	Металло-тионеин 3	Металло-тионеин 4	Металло-тионеин 5	Убиквитин Б	Белок p53	
		MTL1	MTL2	MTL3	MTL4	MTL5	UBB	TP53	
1	Необлучённые	193,3 $\pm$ 3,9	145,9 $\pm$ 2,9	137,1 $\pm$ 2,7	128,2 $\pm$ 2,6	175,5 $\pm$ 3,5	569,9 $\pm$ 11,4	150,9 $\pm$ 3,0	
20	Облучённые нелеченные	1,04 $\pm$ 0,02*	0,79 $\pm$ 0,02*	0,74 $\pm$ 0,02*	0,69 $\pm$ 0,01*	0,95 $\pm$ 0,02*	3,08 $\pm$ 0,06*	447,8 $\pm$ 9,0*	
	Аутотрансплантация	Фибробласты	0,39 $\pm$ 0,01*	3,27 $\pm$ 0,07*	1,70 $\pm$ 0,04*	1,07 $\pm$ 0,02*	32,0 $\pm$ 0,7*	1,91 $\pm$ 0,03*	1,31 $\pm$ 0,03*
		Фибробласты и кератиноциты	406,4 $\pm$ 8,1*,**	212,1 $\pm$ 4,3*,**	281,4 $\pm$ 5,6*,**	216,5 $\pm$ 4,3*,**	402,1 $\pm$ 8,0*,**	424,4 $\pm$ 8,5*,**	214,7 $\pm$ 4,3*,**
35	Облучённые нелеченные	0,37 $\pm$ 0,01*	0,28 $\pm$ 0,01*	0,26 $\pm$ 0,01*	0,25 $\pm$ 0,01*	0,34 $\pm$ 0,01*	1,10 $\pm$ 0,02*	0,29 $\pm$ 0,01*	
	Аутотрансплантация	Фибробласты	56,7 $\pm$ 1,1*	52,1 $\pm$ 1,0*	51,3 $\pm$ 1,0*	53,5 $\pm$ 1,1*	55,3 $\pm$ 1,1*	94,5 $\pm$ 1,9*	52,6 $\pm$ 1,0*
		Фибробласты и кератиноциты	650,3 $\pm$ 13,0*,**	339,4 $\pm$ 6,8*,**	450,3 $\pm$ 9,0*,**	346,4 $\pm$ 7,1*,**	643,3 $\pm$ 13,0*,**	689,0 $\pm$ 13,8*,**	343,5 $\pm$ 6,9*,**

\* – различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с необлучёнными животными;

\*\* – различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с трансплантацией аутофибробластами на соответствующие сутки.

Как видно, в зоне ожога у облучённых животных, которых не лечили аутотрансплантацией, экспрессия генов всех металлотионеинов после облучения существенно и одинаково – в 185 раз снижается на 20-е сутки, а на 35-е она меньше контроля, в среднем, в 520 раз. При трансплантации только аутофибробластами и на 20-е, и на 35-е сутки экспрессия этих генов по-прежнему ниже контроля, хотя и в меньшей степени, чем у нелеченных животных. В то же время трансплантация смесью аутофибробластов с аутокератиноцитами повышает экспрессию этих белков по отношению к контролю – в среднем в 2 и 3 раза на 20-е и 35-е сутки соответственно.

При этом содержание металлотионеинов в зоне ожога у нелеченных животных в первые же сутки после облучения резко падает и в течение всей продолжительности эксперимента остаётся близкой к нулю. Нормализация их содержания при трансплантации аутофибробластами наступает только на 35-е сутки. Смесь аутофибробластов с аутокератиноцитами уже на 20-е сутки приводит к превышению содержания металлотионеинов, в среднем в 6, а на 35-е – в 10 раз по отношению к контролю.

Аналогичным образом изменяются экспрессия гена убиквитина Б и его содержание в зоне ожога у облучённых нелеченных и леченных обоими видами аутотрансплантации животных.

**Таблица 2.**  
**Влияние аутотрансплантации фибробластами и смесью фибробластов с кератиноцитами в зону лучевого ожога кожи у морских свинок на динамику содержания в ней металлотионеинов, убиквитина и белка р53, rflu/мг ткани**

Сутки после облучения	Условия облучения и лечения животных	Белок						
		Металло-тионеин 1	Металло-тионеин 2	Металло-тионеин 3	Металло-тионеин 4	Металло-тионеин 5	Убиквитин Б	Белок р53
1	Необлучённые	657±13	496±10	466±9,3	436±8,7	597±12	1938±39	513±10
20	Облучённые нелеченные	7±0,14*	5±0,10*	5±0,10*	5±0,01*	7±0,14*	21±0,42*	3108±62*
	Аутотрансплантация	51±1,0*	93±1,9*	59±1,2*	114±2,3*	54±1,1*	51±1,0*	781±16*
35	Облучённые нелеченные	4462±89**,**	2328±47**,**	3089±62**,**	2376±48**,**	4413±88**,**	4659±93**,**	557±71**,**
	Аутотрансплантация	623±12*	572±11*	563±11*	587±12*	607±12*	1037±21*	578±12*
	Аутотрансплантация	7138±143**,**	3726±75**,**	4943±99**,**	3802±76**,**	7061±141**,**	7564±151**,**	771±15**,**

\* – различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с необлучёнными животными;

\*\* – различия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с трансплантацией аутофибробластами на соответствующие сутки.

Полученные результаты качественно совпадают с динамикой экспрессии генов ферментов антиоксидантного стресса и их содержанием в зоне ожога у облучённых нелеченных животных. Совпадает также и характер возвращения измеренных показателей и показателей оксидативного стресса к контрольным значениям при аутотрансплантации в зону ожога (Altukhova et al., 2015).

Это указывает на участие металлотионеинов и убиквитина Б в процессах антиоксидантной защиты от свободных радикалов, возникающих в зоне ожога в результате облучения.

Совершенно по-иному выглядит динамика экспрессии гена и содержания белка р53 в зоне ожога у животных, как нелеченных, так и леченных аутоототрансплантацией. Так, у нелеченных животных непосредственно после облучения экспрессия гена р53 в этой зоне возрастает и на 20-е сутки превышает контроль в 3 раза, а на 35-е экспрессия практически исчезает. При введении фибробластов экспрессия гена р53 резко снижается на 20-е и повышается на 35-е сутки после облучения, оставаясь всё же втрое ниже контроля. Введение же смеси аутофибробластов с аутокератиноцитами регулярно повышает экспрессию этого гена – в 1,4 и 2,3 раза на 20-е и 35-е сутки соответственно по отношению к контролю.

При этом значительное – в 6 раз большее, чем в контроле, содержание белка р53 в зоне ожога у облучённых нелеченных животных наблюдается на протяжении всего эксперимента. Введение как фибробластов, так и смеси аутофибробластов с аутокератиноцитами снимает это превышение, так что и на 20-е, и на 35-е сутки содержание этого белка в зоне ожога близко к величине контроля, отличаясь от него не более чем в 1,5 раза.

Обнаруженные особенности динамики экспрессии гена и содержания белка р53 в зоне лучевого ожога у животных, как нелеченных, так и леченных аутоототрансплантацией, хорошо согласуются с его функциональной ролью. Среди стрессовых стимулов, которые приводят к активации белка р53, ионизирующее излучение играет немаловажную роль (Абраменко и др., 2008). Ведущим фактором при этом являются повреждения ДНК, возникающие при гибели клеток как в результате прямого действия радиации во время облучения, так и под воздействием свободных радикалов, непрерывно появляющихся впоследствии в результате цепных процессов. Поэтому у нелеченных животных экспрессия гена р53 наиболее высока именно в первое время после облучения, в период массовой

гибели клеток. Регулярное введение только аутофибробластов в зону ожога в используемом количестве оказывается недостаточным для нормализации уровня экспрессии и содержания белка p53. Смесь же аутофибробластов с аутокератиноцитами оказывается более эффективной.

### Выводы

1. Развитие в течение 35 суток после облучения рентгеновского ожога кожи у морских свинок сопровождается непрерывным снижением экспрессии генов металлотионеинов 1–5, убиквитина Б и содержания этих белков с одновременным повышением экспрессии гена белка p53 и его содержания в зоне ожога.

2. Эти различия связаны с преимущественным участием белка p53 в процессах апоптоза облучённых клеток, а металлотионеинов 1–5 и убиквитина Б – в нейтрализации возникших при облучении свободных радикалов.

3. Введение в зону ожога аутофибробластов или их смеси с аутокератиноцитами в концентрациях, соответствующих таковым в здоровой коже, повышает (в большей степени клеточная смесь) экспрессию генов металлотионеинов 1–5 и убиквитина Б и их содержания при снижении экспрессии гена белка p53 и нормализации его содержания.

### Список литературы

- Абраменко И.В., Завгородняя А.В., Балан В.И. и др. Индукция p53-зависимого апоптоза под действием ионизирующего излучения в лимфоидных клетках больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом // Онкология. – 2008. – Т.10, №2. – С. 225–229. /Abramenko I.V., Zavgorodnyaya A.V., Balan V.I. i dr. Induktsiya p53-zavisimogo apoptoza pod deystviyem ioniziruyushchego izlucheniya v limfoidnykh kletkakh bol'nykh V-kletochnym khronicheskim limfoleykozom // Onkologiya. – 2008. – Т.10, №2. – С. 225–229./
- Алтухова Л.В., Гриценко М.А., Кот Е.В. и др. Нормализация содержания соединительнотканых клеток и структурных биополимеров межклеточного матрикса в зоне локального лучевого ожога кожи объемной трансплантацией аутофибробластов // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2013. – №1079, вип.18. – С. 5–8. /Altukhova L.V., Gritsenko M.A., Kot Ye.V. i dr. Normalizatsiya sodержaniya soyedinitel'notkannykh kletok i strukturnykh biopolimerov mezhklyetchnogo matriksa v zone lokal'nogo lucheвого ozhoga kozhi obyemnoy transplantatsiyey autofibroblastov // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2013. – №1079, vyp.18. – С. 5–8./
- Алтухова Л.В., Кот Е.В., Кот Ю.Г. и др. Сравнение эффективности тормозящего действия объемной аутотрансплантации фибробластов и композиции фибробластов с кератиноцитами на развитие локального лучевого ожога кожи // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2015. – Вип.24, №1153. – С. 103–109. /Altukhova L.V., Kot Ye.V., Kot Yu.G. i dr. Sravneniye effektivnosti tormozyashchego deystviya obyemnoy autotransplantatsii fibroblastov i kompozitsii fibroblastov s keratinotsitami na razvitiye lokal'nogo lucheвого ozhoga kozhi // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2015. – Vyp.24, №1153. – С. 103–109./
- Данилин И.А. Металлотионеины как биомаркеры при действии на организм тяжёлых металлов и ионизирующего излучения. Дисс. ... д-ра биол. наук. – М., 2010. – 287с. /Danilin I.A. Metallotioneiny kak biomarkery pri deystvii na organizm tyazhyolykh metallov i ioniziruyushchego izlucheniya. Diss. ... d-ra biol. nauk. – М., 2010. – 287s./
- Келлер Г., Себастиан Дж., Лакомбе Ю. и др. Сохранность инъецируемых аутологичных человеческих фибробластов // Бюл. Эксп. Биол. Мед. – 2000. – Т.130 (8). – С. 203–206. /Keller G., Sebastian Dzh., Lakombe Yu. i dr. Sohrannost' inyetsiruyemykh autologichnykh chelovecheskikh fibroblastov // Byul. Eksp. Biol. Med. – 2000. – Т.130 (8). – С. 203–206./
- Кот Ю.Г., Кот Е.В., Перский Е.Э. и др. Торможение развития локального лучевого ожога объемной аутотрансплантацией фибробластов // Доповіді Національної академії наук України. Математика, природознавство, технічні науки. – 2013. – №4. – С. 144–147. /Kot Yu.G., Kot Ye.V., Perskiy Ye.E. i dr. Tormozheniye razvitiya lokal'nogo lucheвого ozhoga obyemnoy autotransplantatsiyey fibroblastov // Dopovidi Natsional'noi akademii nauk Ukrainy. Matematyka, pryrodoznavstvo, tehnicni nauky. – 2013. – №4. – С. 144–147./
- Кутяков В.А., Салмина А.Б. Металлотионеины как сенсоры и регуляторы обмена металлов в клетках // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т.13, №3. – С. 91–99. /Kutyakov V.A., Salmina A.B. Metallotioneiny kak sensory i regulatory obmena metallov v kletkakh // Byulleten' sibirskoy meditsiny. – 2014. – Т.13, №3. – С. 91–99./
- Пыхтеева Е.Г. Металлотионеин: биологические функции. 2. Роль металлотионеина в защите от оксидативного стресса // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2010. – №1 (19). – С. 114–120. /Pykhteyeva Ye.G. Metallotionein: biologicheskiye funktsii. 2. Rol' metallotioneina v zashchite ot oksidativnogo stressa // Aktual'nyye problemy transportnoy meditsiny. – 2010. – №1 (19). – С. 114–120./
- Altukhova L.V., Kot K.V., Kot Yu.G. et al. Biochemical mechanisms of skin radiation burns inhibition and healing by the volumetric autotransplantation of fibroblasts and keratinocytes with fibroblasts composition //

- 
- Вісник Дніпропетровського університету. Серія: Біологія. Екологія. – 2015. (в печаті). *Visnyk Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriya: Biologiya. Ekologiya.* – 2015./
- Blomme E.A., Sugimoto Y., Lin Y.C. et al. Parathyroid hormone-related protein is a positive regulator of keratinocyte growth factor expression by normal dermal fibroblasts // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 1999. – Vol.152. – P. 189–197.
- Glantz S.A. Primer of biostatistics. 4th edition. – McGraw-Hill, 2007. – 298p.
- Kimura Y., Tanaka K. Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis // *J. Biochem.* – 2010. – Vol.147 (6). – P. 793–798.
- Lowe S.W., Schmitt E.M., Smith S.W. et al. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes // *Nature.* – 1993. – Vol.362. – P. 847–849.
- Rittié L., Fisher G.J. Isolation and culture of skin fibroblasts // *Methods in Molecular Medicine.* – 2005. – Vol.117. – P. 83–98.
- Schnell J.D., Hicke L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol.278 (38). – P. 35857–35860.
- Shaw A.J. Epithelial cell culture. Reconstruction of human skin epidermis in vitro. The practical approach series. / Ed. D.Richwood, B.D.Hames. – 1996. – P. 179–200.
- Werner S., Krieg T., Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing // *J. Invest. Dermatol.* – 2007. – Vol.127 (5). – P. 998–1008.

---

**Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov**

**Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina**

*Подано до редакції / Received: 01.10.2015*